

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg (Lahn)
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

THESIS

MARBURG

1968

Agar- und immunelektrophoretische Untersuchungen
über die Antigenstruktur von *Candida utilis*

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Ulrike Griebel

aus Sondershausen/Thür.

Marburg 1968

Agar- und immunelektrophoretische Untersuchungen über die Antigenstruktur von *Candida utilis*

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Ulrike Griebel

aus Sondershausen/Thür.

Marburg 1968

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg/Lahn am: 12.8.68

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Professor Dr. med. R. Siegert

Referent: Frau Doz. Dr. med. H.-L. Müller

Correferent: Professor Dr. med. R. Siegert

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
A. <u>Einleitung</u>	1
B. <u>Methodik</u>	3
I. Stämme	3
II. Antigengewinnung	4
III. Antigenextraktionen	4
IV. Gewinnung der Immunsereen	5
V. Absorptionsversuche	6
VI. Agar- und Immunelektrophorese	6
C. <u>Ergebnisse</u>	8
I. Agarelektrophorese des Homogenisats	8
II. Immunelektrophorese des Homogenisats mit dem homologen Immunsereum	9
III. Nachweis thermolabiler Antigene	10
IV. Kreuzreaktionen mit heterologen Sprosspilzen	12
V. Prüfung heterologer Sprosspilze auf gemeinsame thermolabile Antigene mit Candida utilis	15
VI. Versuche zur Antigenisolierung an Candida utilis	16
VII. Kreuzreaktionen der Ammonsulfat-Fractionen von Candida utilis mit heterologen Sprosspilzen	22
D. <u>Besprechung</u>	26
E. <u>Zusammenfassung</u>	32
F. <u>Literatur</u>	34



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A. Einleitung

Unter den Sproßpilzen, die als Krankheitserreger bei Mensch und Tier bekannt sind, besitzt die fakultativ-pathogene Candida-Gruppe aufgrund ihres häufigen Vorkommens eine besondere Bedeutung. *C. utilis* wurde bisher zwar nicht als Krankheitserreger beschrieben, kann aber - wie alle anderen Hefearten - als Saprophyt im Untersuchungsmaterial vorkommen, vor allem bei Menschen, die beruflich mit ihr in Berührung kommen; sie wird in größerem Ausmaß als Nähr- und Futterhefe und zur Gewinnung von Hefe-RNS gezüchtet (BUTSCHEK und KLEMM, 1962).

Es ist deshalb wichtig, auch die Saprophyten eindeutig differenzieren und von fakultativ pathogenen Erregern abtrennen zu können.

C. utilis, früher zu den *Torulopsis*-Arten gerechnet, seit dem grundlegenden Werk von LODDER und KREGER-VAN RIJ (1952) zu den Candida-Arten gezählt, ist eine Hefe, die Sproßzellen von $(3-3,5) \times (5-9) \mu$ Durchmesser und Pseudomyzel bildet. Sie wächst auf den üblichen Pilznährböden bei 30°C üppig in Form von glatten, cremefarbenen Kolonien. Von den Zuckern Glucose, Galaktose, Saccharose, Maltose und Laktose werden Glucose und Saccharose vergoren und Glucose, Saccharose und Maltose assimiliert.

Die bisher übliche biochemische Differenzierung erfordert einen erheblichen Zeit- und Materialaufwand; zudem zeigen die Fermentation und Assimilation von Zuckern durch *C. utilis* enge Beziehungen zu den *Hansenula*-Arten, die ebenfalls häufig in der Natur vorkommen und nicht selten zu Infektionen im Gärungsgewebe führen (WINDISCH, 1960). Zur Abtrennung des Genus *Hansenula* vom Genus *Candida*, besonders von *C. utilis*, sind zusätzliche serologische Methoden wünschenswert.

Dies erkannte vor allem TSUCHIYA (1959, 1965) und bemühte sich, eine serologische Differenzierung mit Hilfe von absorbierten Seren durchzuführen und Antigenschemata aufzustellen. TSUCHIYA konnte jedoch mit seiner Methode - Immunisierung und Absorption der Antiseren mit intakten Hefezellen - nur die Zellwandantigene erfassen.

Nach MÜLLER und HIRSCH (1967) sind in den Zellwänden nur Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigene vorhanden, während im Zellinhalt zusätzlich noch Eiweißantigene vorkommen. Diese Eiweißantigene besitzen ebenfalls für die Klassifizierung der Hefen grundsätzliche Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wird deshalb die Gesamtantigenstruktur von *C. utilis*, einschließlich der Eiweißantigene, mit Hilfe der Immunelektrophorese an zertrümmertem Zellmaterial untersucht. Diese Analyse hatte die serologische Differenzierung bzw. Aufdeckung von Antigengemeinschaften mit anderen Sproßpilzen zum Ziel.

B. Methodik

I. Stämme

<u>Species:</u>	<u>Herkunft:</u>
<u>Candida utilis</u> 840	CBS*
Candida albicans 256	CBS
Candida tropicalis 94	CBS
Candida pseudotropicalis	CBS
Candida stellatoidea 1905	CBS
Candida curvata	Hygiene-Institut Würzburg
Candida krusei 573	CBS
Candida guilliermondii 566	Hygiene-Institut Würzburg
Candida reukauffii S 56-192	Hygiene-Institut Würzburg
Candida brumptii	Hygiene-Institut Würzburg
Candida lipolytica	Hygiene-Institut Würzburg
Candida parapsilosis	Dermatolog.Klinik Marburg
Candida scottii CBS 2300	Hygiene-Institut Würzburg
Candida macedoniensis S 37-81	Hygiene-Institut Würzburg
Candida robusta 2270	CBS
Saccharomyces cerevisiae 1172	CBS
Saccharomyces rouxii 732	CBS
Torulopsis dattila	Dermatolog.Klinik Marburg
Torulopsis glabrata 5311	Hygiene-Institut Würzburg
Torulopsis famata 935	Hygiene-Institut Würzburg
Torulopsis inconspicua S 181-315	Hygiene-Institut Würzburg
Schizosaccharomyces octosporus	CBS
Cryptococcus neoformans	Hygiene-Institut Würzburg
Rhodotorula mucilaginosa	Dermatolog.Klinik Marburg

* CBS = Centralbureau voor Schimmelcultures, Delft

II. Antigengewinnung

1. Züchtung: Nach einer Vorkultur von 6 bis 8 Stunden wurde der in Glattform vorliegende Stamm auf Sabouraud-Maltose-Agar (Difco) in Rouxflaschen überimpft und 48 Stunden bei 30°C bebrütet. Danach wurde der Zellrasen mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt, die Hefesuspension 10 Minuten bei ca. 3000 UpM zentrifugiert und das Sediment dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

2. Homogenisieren: Die Hefezellen wurden in physiologische Kochsalzlösung aufgenommen und in einer ca. 50 Vol.-%igen Suspension im Zellhomogenisator der Firma Braun, Melsungen, mit Glasperlen von 0,5 mm Durchmesser bei 2800 UpM 4 Minuten lang homogenisiert. Das gewonnene Homogenisat diente in konzentrierter Form als Antigen für die Immunelektrophorese, in verdünnter zum Immunisieren.

3. Trennung von Zellinhalt und Zellwänden: Die Homogenisate wurden 10 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert, und die abgeschleuderten Zellwände von dem überstehenden Inhalt getrennt. Der abgehobene Zellinhalt erwies sich mikroskopisch als weitgehend rein, während die Zellwände durch Waschen in Aqua dest. (30- bis 40-mal) von Inhaltsresten befreit werden mußten.

III. Antigenextraktionen

1. Ammonsulfatfällung: Der frische Inhalt der Hefezellen wurde einer fraktionierten Behandlung mit gesättigtem Ammonsulfat unterworfen. Dabei ergab die 50%ige Sättigung nach 4 Stunden bei 4°C einen geringen Niederschlag, der abzentrifugiert oder abfiltriert wurde. Dieser Niederschlag löste sich weder in NaCl noch in Aqua dest.; er wurde in physiologische Kochsalzlösung aufgenommen und gegen Kochsalz dialysiert (3 bis 4 Tage bei 4°C). Der

Überstand bzw. das Filtrat wurde auf eine 90%ige Ammonsulfatsättigung gebracht. Nach 12 bis 24 Stunden, wieder bei 4°C, zeigte sich ein reichlicher Niederschlag, der abzentrifugiert wurde und sich zum überwiegenden Teil in Aqua dest. bzw. NaCl löste. Aufnahme in NaCl und Dialyse wie beim 50%igen Niederschlag.

Der Überstand nach 90%iger Sättigung wurde 3 bis 4 Tage gegen Leitungswasser und 1 Tag gegen Aqua dest. dialysiert und anschließend mit dem Rotationsverdampfer auf 1/3 bis 1/5 der Ausgangsmenge des Zellinhalts eingeeengt.

2. Phenol/Wasser-Extraktion nach WESTPHAL (Kälteauszug): 40 ml Zellinhalt und 66 ml 70%iges Phenol wurden in Eiswasser 1/2 Stunde gerührt. Die durch Zentrifugieren gewonnene wäßrige Phase wurde mit der sechsfachen Menge Äthanol und einem Natriumacetat-Äthanol-Zusatz versetzt. Der nach 24 Stunden in der Kälte entstandene Niederschlag wurde in absolutem Alkohol gewaschen, getrocknet und in Aqua dest. aufgenommen.

3. KOH-Extraktion: Gewaschene Zellwände wurden mit der gleichen Menge 1m KOH versetzt und die jeweiligen Gemische 1/2 Stunde auf dem Magnetrührer bei Zimmertemperatur gerührt. Danach wurde der Ansatz zentrifugiert (10 Min. bei ca. 3000 UpM), der Überstand gegen Leitungswasser dialysiert und anschließend mit der sechsfachen Menge Äthanol und einem Natriumacetat-Äthanol-Zusatz versetzt. Die Aufarbeitung erfolgte wie bei der Phenol/Wasser-Extraktion.

IV. Gewinnung der Immunseren

Mit dem in physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Homogenisat sowie den Niederschlägen nach 50%iger und 90%iger Ammonsulfatfällung und dem Überstand nach alleiniger 90%iger Ammonsulfatfällung wurden nach Sterilitätskontrolle (aerob und anaerob) Kaninchen 3 Wochen lang intravenös behandelt. In der ersten Woche erhielten die Tiere täglich

ansteigende Dosen von 0,5 bis 2 ml, in den beiden folgenden Wochen jeden zweiten Tag 2 ml. Die erste Blutentnahme erfolgte 4 bis 5 Tage nach der letzten Injektion. Die Antikörperbildung wurde in der Immunelektrophorese kontrolliert; die Injektionen erfolgten solange, bis genügend Antikörper gebildet waren.

V. Absorptionsversuche

1 ml unverdünntes Serum wurde mit 2 ml nicht erhitztem bzw. erhitztem Zellsediment versetzt. Nach einstündiger Inkubation im Wasserbad (37°C) wurde das Reaktionsgemisch über Nacht im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt und nach Zentrifugation das Serum abgehoben.

VI. Agar- und Immunelektrophorese

Die Durchführung der Agar- und Immunelektrophorese erfolgte in der LKB-Apparatur. Verwendung fand der von MICHAELIS angegebene Diaethylbarbitursäurepuffer pH 8,2, Ionenstärke 0,1. Die Objektträger wurden mit 1,2%igem Agar beschickt. Dazu waren 1,2 g Agar Special-Noble (Difco) in 100 ml des mit Wasser im Verhältnis 1 : 2 verdünnten Puffers 15 Minuten im Wasserbad (100°C) erhitzt und gelöst worden.

1. Agarelektrophorese: Nach dem Erstarren des Agars auf den Objektträgern wurden mit einem 5 mm breiten Fließpapierstreifen Gräben durch Aufsaugen senkrecht zur Wanderungsrichtung ausgehoben. In diese wurden die Antigene eingefüllt und 1 Stunde bei 250 Volt (10 Volt/cm) in der Elektrophoresekammer aufgetrennt. Zur Darstellung der Eiweiße erfolgte eine Fixierung der Objektträger für 10 Stunden in Methanol-Eisessig-Wasser im Verhältnis 9:1:5 und nach Trocknung der Präparate unter Fließpapier Färbung mit Amidoschwarz. Zur Darstellung der Polysaccharide wurden die Objektträger in 90%igem Alkohol fixiert und mit PAS gefärbt.

2. Immunelektrophorese: Nach Absaugen des Agars aus den vorgestanzten Löchern ober- und unterhalb eines Grabens wurden die Antigene eingebracht und wie unter VI, 1 aufgetrennt. Danach wurde in den ausgehobenen Graben reichlich Serum eingefüllt. Bis zur völligen Entwicklung der Präzipitationslinien in der feuchten Kammer bei 4°C vergingen im allgemeinen 48 Stunden. Durch Spülen der Objektträger in physiologischer Kochsalzlösung wurden die überschüssigen und nicht gebundenen Eiweiße entfernt. Danach wurden die Präparate unter Fließpapier getrocknet und mit Amidoschwarz gefärbt. Die Differenzierung erfolgte gegen Methanol-Eisessig.

C. E r g e b n i s s e

=====

I. Agarelektrophorese des Homogenisats

Das Homogenisat von C. utilis wurde in unerhitztem und erhitztem Zustand geprüft.

Bei der Agarelektrophorese mit dem nicht erhitzten Homogenisat traten zwei unterschiedliche Substanzgruppen auf. Die eine Gruppe wanderte zur Kathode und färbte sich intensiv mit PAS an. Sie gliederte sich in vier Fraktionen: eine dicht am Auftragungspunkt liegende, eine breite mittlere Fraktion, deren Färbung nicht ganz einheitlich war, und zwei schnell wandernde, schmale Fraktionen (Abb. 1a). Nur die mittlere Fraktion wurde auch mit Amidoschwarz deutlich. Die andere Substanzgruppe wanderte zur Anode und ließ sich mit Amidoschwarz, nicht dagegen mit PAS darstellen. Es entstand eine scharf abgegrenzte Bande (Abb. 1b).

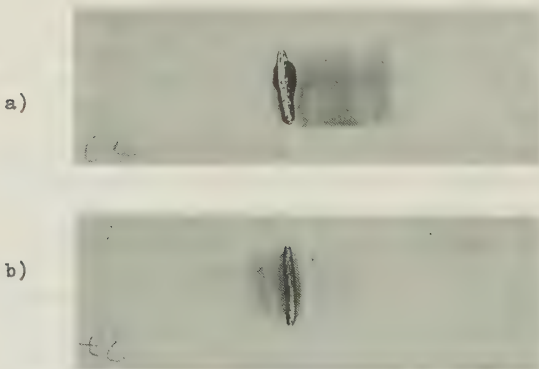


Abb. 1 Agarelektrophorese des nicht erhitzten Homogenisats: a) nach Färbung mit PAS; b) nach Färbung mit Amidoschwarz.

Beim Erhitzen des Homogenisats auf 100°C erwies sich nur ein Teil der Antigene als hitzebeständig. Die Bande auf der Anodenseite, die sich nur durch Amidoschwarz darstellen ließ, war nach Erhitzen nicht mehr nachweisbar. Dagegen war eine breitere Fraktion, die sich nur schwach mit Amidoschwarz, aber deutlich mit PAS anfärbte, zur Anode gewandert. Auf der Kathodenseite wurden Substanzspuren mit PAS sichtbar (Abb. 2). Im Gegensatz zum unerhitzten Homogenisat, wo sich die PAS-positive Substanz nur auf der Kathodenseite darstellte, wanderte also diesmal der größere Anteil zur Anode.



Abb. 2 Agarelektrophorese des erhitzten Homogenisats. Färbung mit PAS.

II. Immunelektrophorese des Homogenisats mit dem homologen Immunserum

Die Agarelektrophorese ergab eine Auftrennung des Homogenisats in zwei Substanzgruppen, deren antigene Wirksamkeit in der Immunelektrophorese zu prüfen war.

Das Homogenisat wurde nach der Auftrennung im elektrischen Feld mit dem dagegen gerichteten Immunserum (Anti-C.utilis-Serum) zur Reaktion gebracht. Dabei entstanden am Auftragspunkt, auf der Anoden- und Kathodenseite Präzipitationslinien analog den in der Agarelektrophorese aufgetretenen Substanzen. Die Präzipitate am Auftragspunkt waren von Substanzen verursacht, die im elektrischen Feld keine Beweglichkeit zeigten und somit der einen oder anderen Gruppe zuzuordnen sind. Wie Abb. 3a zeigt, ließen sich auf der

Anodenseite wenigstens 3, am Auftragspunkt 2 und auf der Kathodenseite ebenfalls 3 Präzipitationslinien erkennen. Die Linien auf der Anodenseite verteilten sich bis zum Ende des Grabens, waren zart ausgeprägt und gut voneinander abgegrenzt. Am Auftragspunkt und auf der Kathodenseite zeichneten sich die Linien stärker ab und lagen dichter beieinander; die Wanderungsbewegung auf der Kathodenseite war geringer als auf der Anodenseite.

Aus den auf der Anodenseite, am Auftragspunkt und auf der Kathodenseite aufgetretenen Präzipitationslinien folgt, daß beide Substanzgruppen der Hefe serologisch aktiv sind.

III. Nachweis thermolabiler Antigene

TSUCHIYA hat 1959 ein thermolabiles Antigen bei *C. utilis* beschrieben. Er absorbierte Seren, die gegen nicht erhitzte Zellen gerichtet waren, mit erhitzten Zellen und prüfte sie mit unerhitzten Zellen mit Hilfe der Objektträgeragglutination. Wir verwendeten zum Nachweis thermolabiler Antigene die Immunelektrophorese mit erhitzten Antigenen sowie die Absorption mit erhitzten, intakten Zellen.

1. Immunelektrophorese mit erhitzten Antigenen:

Das Homogenisat von *C. utilis* wurde auf 60° und 100°C erhitzt und mit dem Anti-*C. utilis*-Serum getestet. Nach Erhitzen auf 60°C wiesen die Präzipitationslinien gegenüber dem nicht erhitzten Homogenisat auf der Kathodenseite keine Veränderungen auf, während sich auf der Anodenseite nur noch 2 Linien zeigten. Nach Erhitzen auf 100°C waren auf der Kathodenseite keine Linien mehr nachweisbar, auf der Anodenseite stellte sich dagegen eine breite Präzipitation dar. Wie die Agarelektrophorese bereits zeigte, projiziert sich der hitzebeständige Anteil des Homogenisats größtenteils auf die Anodenseite; das breite Präzipitat entspricht demnach der Restfraktion in der Agarelektrophorese.

a)

b)

c)

Abb. 3 Immunelektrophorese mit dem Serum gegen das Homogenisat und dem a) nicht erhitzten, b) auf 60°C erhitzten, c) auf 100°C erhitzten Homogenisat.

2. Absorption mit erhitzten, intakten Zellen:

Im Anschluß daran wurde der Versuch gemacht, mit Hilfe der Absorption thermolabile Antigene nachzuweisen. Die absorbierten Seren wurden jeweils mit dem unerhitzten Homogenisat von *C. utilis* in der Immunelektrophorese geprüft.

Zunächst wurde das Anti-*C. utilis*-Serum mit nicht erhitzten und auf 60°C erhitzten Zellen absorbiert. Damit ließen sich die Antikörper gegen die zur Kathode wandernden Antigene völlig entfernen, während auf der Anodenseite die normalen Präzipitationslinien verblieben. Danach wurden zur Absorption auf 100°C erhitzte Zellen verwendet. Außer den Linien auf der Anodenseite war jetzt eine einzelne Präzipitationslinie auf der Kathodenseite nachweisbar, die durch einen Restantikörper im Serum bedingt sein mußte (Abb. 4).

Um das thermolabile Antigen lokalisieren zu können, wurde

3. eine Prüfung des absorbierten Serums mit Zellwand- und Inhaltsstoffen vorgenommen.

Das mit auf 100°C erhitzten Zellen absorbierte Serum wurde mit der durch die Phenol/Wasser-Extraktion des Inhalts gewonnenen Fraktion geprüft. Dabei kam es zu

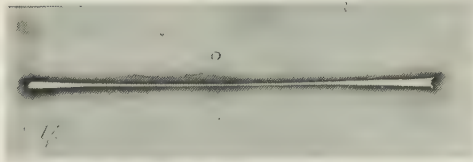


Abb. 4 Immunelektrophorese des mit auf 100°C erhitzten Zellen absorbierten Serums. Oben: nicht erhitztes, unten: auf 100°C erhitztes Homogenisat.

einer einzelnen Präzipitationslinie auf der Kathoden-seite. Der durch KOH-Behandlung gewonnene Extrakt aus den Zellwänden zeigte dagegen keine Reaktion mit dem absorbierten Serum.

IV. Kreuzreaktionen mit heterologen Sproßpilzen

Zur Feststellung antigener Beziehungen von *C. utilis* zu anderen Sproßpilzarten wurden in der Immunelektrophorese Kreuzreaktionen durchgeführt. In einer ersten Versuchsreihe wurde das gegen *C. utilis* gerichtete Immunserum mit einer größeren Gruppe heterologer Sproßpilz-Homogenisate getestet. Eine zweite Versuchsreihe galt der Prüfung der Reaktion des *C. utilis*-Homogenisats mit Immunseren gegen 10 heterologe Sproßpilze.

1. Anti-*C. utilis*-Serum gegen heterologe Sproßpilz-Homogenisate:

Das Serum gegen *C. utilis* wurde mit dem Homogenisat von je 14 verschiedenen *Candida*-, 4 *Torulopsis*-, 2 *Saccharomyces*-arten und je einem Stamm von *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula mucilaginosa* und *Schizosaccharomyces octosporus* geprüft. Die Homogenisate von *C. kru-sei*, *T. dattila*, *T. inconspicua*, *Cr. neoformans* und *Sch. octosporus* zeigten keine Reaktion mit dem Anti-*C. utilis*-Serum.

Unter den Candida-Arten bildeten *C. albicans* und *C. stellatoidea* je 1 Präzipitationslinie in der Nähe des Auftragspunkts mit einem Bogen zur Kathode. Auf der Kathodenseite ergab sich je 1 Präzipitationslinie mit *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. curvata*, *C. robusta*, *C. parapsilosis*, *C. lipolytica*, *C. macedoniensis* und *C. scottii*, während *C. guilliermondii* 2 Linien bildete. Zusätzlich trat je 1 Linie am Auftragspunkt mit *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. curvata*, *C. reukauffii* und *C. parapsilosis* auf. Auf der Anodenseite zeigten je 2 Präzipitationslinien *C. pseudotropicalis* und *C. reukauffii*, während *C. brumptii*, *C. lipolytica* und *C. scottii* jeweils 1 Linie bildeten.

Für die Nicht-Candida-Arten ergab sich folgendes Bild: *S. cerevisiae* und *S. rouxii* sowie *Rh. mucilaginosus* bildeten je 1 Präzipitationslinie auf der Kathodenseite. Mit *T. famata* kam es zu 2 Linien auf der Anodenseite, mit *T. glabrata* zu je 1 Linie auf der Anodenseite und am Auftragspunkt (Tab. 1).

2. C. utilis-Homogenisat gegen heterologe Sproßpilzseren:

In der zweiten Versuchsreihe wurde das Homogenisat von *C. utilis* mit den Seren gegen 7 *Candida*-, 2 *Torulopsis*-arten und 1 *Saccharomyces*-art zur Reaktion gebracht. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Das Homogenisat reagierte mit allen verwendeten Seren. Mit den Seren gegen *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. krusei* und *S. rouxii* traten Präzipitationslinien auf der Anoden- und Kathodenseite sowie - *C. tropicalis* ausgenommen - am Auftragspunkt auf. Mit den Seren gegen *C. pseudotropicalis*, *C. curvata* und *T. glabrata* bildete das Homogenisat Präzipitate am Auftragspunkt und auf der Kathodenseite. Je eine Linie am Auftragspunkt ergab sich mit den Seren gegen *C. robusta* und *T. dattila*.

Tab. 1 Kreuzreaktionen des Anti-C.utilis-Serums
mit heterologen Sproßpilz-Homogenisaten

Antiserum → Antigen →	C. utilis		
	An	A	K
C. utilis	+++	++	+++
C. albicans	-	+	-
C. tropicalis	-	+	+
C. stellatoidea	-	+	-
C. krusei	-	-	-
C. pseudotropicalis	++	+	+
C. curvata	-	+	+
C. robusta	-	-	+
C. guillermondii	-	-	++
C. reukaufii	++	+	-
C. parapsilosis	-	+	+
C. brumptii	+	-	-
C. lipolytica	+	-	+
C. macedoniensis	-	-	+
C. scottii	+	-	+
T. glabrata	+	+	-
T. famata	++	-	-
T. dattila	-	-	-
T. inconspicua	-	-	-
S. cerevisiae	-	-	+
S. rouxii	-	-	+
Cr. neoformans	-	-	-
Rh. mucilaginosa	-	-	+
Sch. octosporus	-	-	-

An = Anode
A = Auftragspunkt
K = Kathode
+ = 1 Präzipitationslinie
- = negative Reaktion

Tab. 2 Kreuzreaktionen des *C. utilis*-Homogenisats mit heterologen Sproßpilzseren

Antigen → Antiserum →	<i>C. utilis</i>		
	An	A	K
<i>C. albicans</i>	+	+	+
<i>C. tropicalis</i>	++	-	+
<i>C. stellatoidea</i>	+	+	+
<i>C. krusei</i>	+	++	+
<i>C. pseudotropicalis</i>	-	+	+
<i>C. curvata</i>	-	+	+
<i>C. robusta</i>	-	+	-
<i>T. glabrata</i>	-	+	+
<i>T. dattila</i>	-	+	-
<i>S. rouxii</i>	++	+	+

An = Anode

A = Auftragspunkt

K = Kathode

+

- = negative Reaktion

V. Prüfung heterologer Sproßpilze auf gemeinsame thermolabile Antigene mit *C. utilis*

Wie die Kreuzreaktionen in der Immunelektrophorese zeigten, bestehen zahlreiche antigene Beziehungen zwischen *C. utilis* und heterologen Sproßpilzen. Es sollte festgestellt werden, ob auch das thermolabile Antigen von *C. utilis* bei anderen Sproßpilzen vorkommt.

Die Prüfung der unter IV,2 aufgeführten Seren gegen heterologe Sproßpilze mit dem nicht erhitzten und dem auf 100°C erhitzten Homogenisat von *C. utilis* erbrachte keine verwertbaren Ergebnisse, da ein Teil der PAS-positiven Antigene - wie unter III,1 beschrieben - die Wanderungsrichtung änderte.

Es wurde deshalb zur Feststellung gemeinsamer thermolabiler Antigene das mit auf 100°C erhitzten Zellen absorbierte Anti-C.utilis-Serum mit den Homogenisaten der entsprechenden Sproßpilze, bei denen bereits thermolabile Antigene nachgewiesen waren, zur Reaktion gebracht. Auch das Homogenisat von C. parapsilosis wurde in diesen Versuch einbezogen, da ein gemeinsames thermolabiles Antigen mit C. utilis bekannt ist (TSUCHIYA, 1959). Nur mit den Homogenisaten von C. stellatoidea und C. parapsilosis trat je 1 Präzipitationslinie in der Nähe des Auftragspunktes auf.

VI. Versuche zur Antigenisolierung an C. utilis

Da Tiere auf ein Antigengemisch, wie es im Homogenisat vorliegt, unterschiedlich reagieren, können die gewonnenen Immunsereen einen durchaus verschiedenen Antikörpergehalt aufweisen. Deshalb wurde versucht, die Antigene von C.utilis weiter aufzutrennen, um mit einzelnen Fraktionen immunisieren zu können.

Zur Abtrennung der Eiweißantigene bot sich die von STOLZENBACH (1967) am Inhalt von C. albicans erprobte Methode der fraktionierten Ammonsulfatfällung an. Bei Halbsättigung mit Ammonsulfat am Inhalt von C. utilis konnte ein Niederschlag gewonnen werden, der sich in Aqua dest. und NaCl nicht löste und leicht denaturierte. Bei 90%iger Sättigung mit Ammonsulfat ergab sich ein Niederschlag, der sich zum überwiegenden Teil in Aqua dest. und NaCl löste und nicht so leicht denaturierte. Der nach 90%iger Sättigung verbliebene Überstand wurde ebenso wie die Niederschläge auf antigene Eigenschaften untersucht. Da bei der Aufbereitung der Fraktionen nicht immer unter sterilen Kautelen gearbeitet werden konnte (z.B. Dialyse), wurden dem unlöslichen Niederschlag nach 50%iger Ammonsulfatfällung vor der Verwendung zum Immunisieren Antibiotica zugesetzt und der lösliche Niederschlag nach 90%iger Ammonsulfatfällung sowie der Überstand nach 90%iger Ammonsulfat-

fällung durch bakteriendichte Filter gegeben. Zum Immunisieren diente jeweils ein Gemisch der Fraktion aus mehreren Chargen.

Polysaccharidantigene wurden aus dem Inhalt mit Hilfe der Phenol/Wasser-Extraktion nach WESTPHAL extrahiert. Zur Schonung thermolabiler Substanzen kam die Kaltextraktion, bei den Zellwänden die Extraktion mit 1 m-KOH bei Zimmertemperatur zur Anwendung.

1. Niederschlag nach 50%iger Ammonsulfatfällung:

In der Agarelektrophorese stellten sich Substanzspuren auf der Kathodenseite dar, die sich mit PAS anfärbten. Die Amidoschwarzfärbung erbrachte ein negatives Ergebnis. Die Biuretprobe fiel schwach positiv aus.

In der Immunelektrophorese mit dem Anti-C.utilis-Serum bildete der Niederschlag 2 Präzipitationslinien auf der Anodenseite und 1 auf der Kathodenseite (Abb. 5a). Das Antiserum nach Immunisierung mit diesem Niederschlag enthielt, wie die Immunelektrophorese mit dem Homogenisat von C. utilis zeigte (siehe Abb. 6a), 4 Antikörper, die sich gegen Antigene auf der Anodenseite, und 1 Antikörper, der sich gegen 1 Antigen auf der Kathodenseite richteten.

2. Niederschlag nach 90%iger Ammonsulfatfällung:

Der Niederschlag stellte sich in der Agarelektrophorese mit Amidoschwarz nicht dar, obwohl die Biuretprobe positiv war. Bei der PAS-Färbung wurde eine schwache Fraktion auf der Anodenseite und eine breite Fraktion auf der Kathodenseite sichtbar.

In der Immunelektrophorese bildete der Niederschlag mit dem Anti-C.utilis-Serum 4 Präzipitationslinien auf der Anodenseite, 1 Präzipitationslinie am Auftragspunkt und 1 auf der Kathodenseite (Abb. 5b).

Die Immunisierung führte zu 4 Antikörpern gegen Antigene auf der Anodenseite und 1 Antikörper gegen 1 Antigen auf der Kathodenseite, wie die Prüfung des Immunserums mit dem C.utilis-Homogenisat ergab (Abb. 6b).

3. Überstand nach 90%iger Ammonsulfatfällung:

Mit Amidoschwarz ließ sich bei der agarelektrophoretischen Untersuchung auf der Kathodenseite in der Nähe des Auftragspunktes eine schwache Fraktion nachweisen. Bei der PAS-Färbung stellte sich diese Fraktion deutlicher dar; zusätzlich zeigten sich 2 weiter gewanderte schmale Fraktionen auf der Kathodenseite und eine PAS-positive breite Fraktion auf der Anodenseite (Abb. 7). Die Biuretprobe des Überstandes war negativ.

Die Prüfung des Überstandes in der Immunelektrophorese ergab mit dem Anti-C.utilis-Serum 2 Präzipitationslinien auf der Anodenseite und 4 Präzipitationslinien auf der Kathodenseite (Abb. 5c).

Bei der Immunisierung wurden 3 Antikörper induziert, die mit dem C.utilis-Homogenisat 3 Linien auf der Kathodenseite bildeten (Abb. 6c).

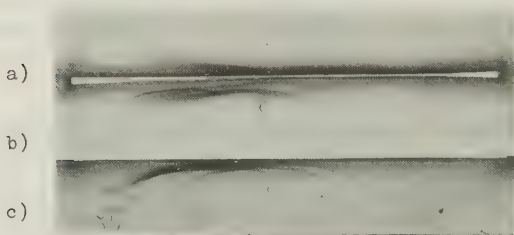


Abb. 5 Immunelektrophorese des Anti-C.utilis-Serums mit den Fraktionen:
a) Niederschlag nach 50%iger,
b) Niederschlag nach 90%iger,
c) Überstand nach 90%iger Ammonsulfatfällung.

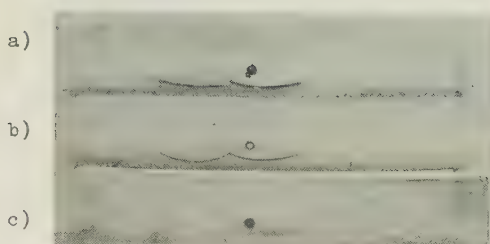


Abb. 6 Immunelektrophorese des C.utilis-Homogenisats mit den Seren gegen die Fraktionen:
a) Serum gegen den Niederschlag nach 50%iger,
b) " " " " " 90%iger,
c) " " " Überstand nach 90%iger
Ammonsulfatfällung.

4. Phenol/Wasser-Extraktion des Inhalts:

Die mit der wäßrigen Phase durchgeführte Agarelektrophorese zeigte eine breite Fraktion auf der Anodenseite, die sich sowohl mit PAS als auch, wenngleich schwächer, mit Amidoschwarz (Abb. 8a) anfärbte. Auf der Kathodenseite ließen sich 3 Fraktionen nur mit PAS darstellen: eine in der Nähe des Auftragspunktes und 2 weiter gewanderte schmale Fraktionen (Abb. 8b). Die Immunelektrophorese mit dem Anti-C.utilis-Serum führte zu 3 Präzipitationslinien auf der Anodenseite, wovon 2 weitgehend ineinander übergingen. Auf der Kathodenseite wurden 1 - 2 Linien sichtbar.

5. KOH-Extraktion der Zellwände:

Der in der Agarelektrophorese geprüfte Auszug ergab auf der Anodenseite mit Amidoschwarz eine langgezogene Fraktion, mit PAS eine besser abgegrenzte, breite Fraktion. Auf der Kathodenseite zeigte sich nur mit der PAS-Färbung eine schwächere, aber weiter ausgezogene Fraktion, die zur Kathode hin von 2 schmalen Banden

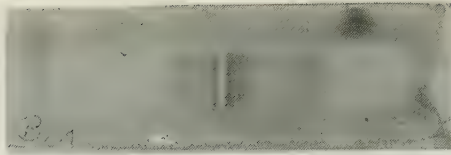


Abb. 7 Agarelektrophorese des Überstandes nach 90%iger Ammonsulfatfällung. PAS-Färbung.

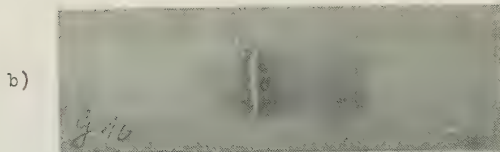


Abb. 8 Agarelektrophorese der Phenol/Wasser-Extraktion des Inhalts:
a) Amidoschwarzfärbung,
b) PAS-Färbung.

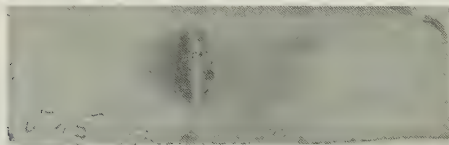


Abb. 9 Agarelektrophorese der KOH-Extraktion der Zellwände. PAS-Färbung.

begrenzt war (Abb. 9).

Bei der immunelektrophoretischen Untersuchung mit dem Anti-C.utilis-Serum bildeten sich 2 schlecht aufgetrennte Präzipitationslinien, die sich von der Anoden- bis zur Kathodenseite erstreckten, wo sich eine 3., schwächere Linie anschloß.

6. Kreuzreaktionen der Fraktionen nach Ammonsulfatfällung:

Um zu prüfen, wie weit die fraktionierte Ammonsulfatfällung wirklich eine Trennung der Antigene bedeutet, wurden die gegen die jeweiligen Fraktionen gerichteten Antiseren mit den beiden Niederschlägen und dem Überstand in der Immunelektrophorese gekreuzt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Während das Serum gegen den Niederschlag nach 50%iger Ammonsulfatfällung mit der entsprechenden Fraktion nur 1 Linie auf der Anodenseite ergab - möglicherweise durch Denaturierung einiger Antigene - , entstanden mit dem Niederschlag nach 90%iger Ammonsulfatfällung 2 Linien auf der Anodenseite. Das Serum bildete mit dem Überstand nach 90%iger Ammonsulfatfällung 2 Präzipitationslinien auf der Kathodenseite.

Das Serum gegen den Niederschlag nach 90%iger Ammonsulfatfällung zeigte mit der entsprechenden Fraktion 3 Präzipitationslinien auf der Anodenseite, 1 am Auftragspunkt und 1 auf der Kathodenseite; es reagierte dagegen nicht mit dem Niederschlag nach 50%iger Ammonsulfatfällung. Mit dem Überstand nach 90%iger Ammonsulfatfällung wurde 1 Linie auf der Kathodenseite gebildet.

Das Serum gegen den Überstand nach 90%iger Ammonsulfatfällung präzipitierte den gleichen Überstand mit 2 Linien auf der Kathoden- und 1 Linie auf der Anodenseite; es reagierte dagegen nicht mit den Niederschlägen nach 50%iger und 90%iger Ammonsulfatfällung.

Tab. 3 Kreuzreaktionen der Fraktionen nach Ammonsulfatfällung

Antiserum →	Ammonsulfatfällung								
	Niederschlag nach 50%iger			Niederschlag nach 90%iger			Überstand nach 90%iger		
Antigen →	An	A	K	An	A	K	An	A	K
Niederschlag nach 50%iger Ammonsulfatfällung	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Niederschlag nach 90%iger Ammonsulfatfällung	++	-	-	+++	+	+	-	-	-
Überstand nach 90%iger Ammonsulfatfällung	-	-	++	-	-	+	+	-	++

An = Anode

A = Auftragspunkt

K = Kathode

+ = 1 Präzipitationslinie

- = negative Reaktion

VII. Kreuzreaktionen der Ammonsulfat-Fraktionen von C. utilis mit heterologen Sproßpilzen

Es sollte festgestellt werden, wie sich die in Kapitel IV beschriebenen Verwandtschaftsreaktionen von C. utilis mit heterologen Sproßpilzen auf die verschiedenen Ammonsulfat-Fraktionen verteilen. Dazu wurden die Fraktionen mit den gegen heterologe Sproßpilze gerichteten Seren sowie heterologe Sproßpilz-Homogenisate mit den gegen die Fraktionen gerichteten Seren in der Immunelektrophorese gekreuzt.

1. Ammonsulfat-Fraktionen gegen heterologe Sproßpilzseren:

Die unter IV,2 benutzte Auswahl heterologer Sproßpilzseren wurde auch für die Kreuzreaktionen mit den Ammonsulfat-Fraktionen verwendet. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

- a) Der Niederschlag nach 50%iger Ammonsulfatfällung reagierte mit den Seren gegen *T. glabrata* und *C. krusei*, und zwar stellten sich, wie aus Tab. 4 hervorgeht, mit dem *T. glabrata*-Serum 2 Linien auf der Anodenseite und mit dem *C. krusei*-Serum 1 Linie am Auftragspunkt dar.
- b) Mit dem Niederschlag nach 90%iger Ammonsulfatfällung entstand auf der Anodenseite 1 Linie mit dem Serum gegen *T. glabrata*, am Auftragspunkt je 1 Linie mit den Seren gegen *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. krusei*, *T. glabrata*, *T. dattila* und *S. rouxii*; auf der Kathodenseite ließ sich jeweils 1 Linie mit den Seren gegen *C. albicans*, *C. krusei*, *C. robusta* und *T. dattila* nachweisen, während die Seren gegen *T. glabrata* und *S. rouxii* 2 Linien bildeten.
- c) Der Überstand nach 90%iger Ammonsulfatfällung zeigte auf der Anodenseite 1 Präzipitation mit den Seren gegen *C. albicans*, *C. stellatoidea* und *C. pseudotropicalis*. Am Auftragspunkt bildete sich mit den Seren gegen *C. albicans* und *C. krusei* jeweils 1 Linie. Auf der Kathodenseite entstanden mit den Seren gegen *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. pseudotropicalis*, *T. dattila* und *S. rouxii* jeweils 1 und mit den Seren gegen *C. robusta* und *T. glabrata* jeweils 2 Linien.

2. Antiseren der Ammonsulfat-Fraktionen gegen heterologe Sproßpilz-Homogenisate:

Es wurde die gleiche Auswahl heterologer Sproßpilz-Homogenisate wie unter IV,1 verwendet. Tab. 5 enthält die Ergebnisse dieser Reaktionen.

- a) Serum gegen den Niederschlag nach 50%iger Ammonsulfatfällung: Auf der Anodenseite präzipitierte das Serum die Homogenisate von *C. albicans* und *C. curvata* mit jeweils 2, die Homogenisate von *C. robusta*, *C. parapilosis*, *C. lipolytica*, *T. famata*, *T. dattila* und *Rh. mucilaginosus* mit jeweils 1 Linie. Zu Reaktionen am Auftragspunkt kam es mit *C. stellatoidea* und *C. krusei*.

Tab. 4 Kreuzreaktionen der Ammonsulfat-Fractionen von
C. utilis mit heterologen Sproßpilzseren

Antigen →	Ammonsulfatfällung								
	Niederschlag nach 50%iger			Niederschlag nach 90%iger			Überstand nach 90%iger		
Antiserum →	An	A	K	An	A	K	An	A	K
C.albicans	-	-	-	-	+	+	+	+	-
C.tropicalis	-	-	-	-	-	-	-	-	+
C.stellatoidea	-	-	-	-	+	-	+	-	+
C.krusei	-	+	-	-	+	+	-	+	-
C.pseudotrop.	-	-	-	-	-	-	+	-	+
C.curvata	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.robusta	-	-	-	-	-	+	-	-	++
T.glabrata	++	-	-	+	+	++	-	-	++
T.dattila	-	-	-	-	+	+	-	-	+
S.rouxii	-	-	-	-	+	++	-	-	+

An = Anode
A = Auftragspunkt
K = Kathode
+ = 1 Präzipitationslinie
- = negative Reaktion

Auf der Kathodenseite bildete das Serum mit den Homogenisaten von C. stellatoidea, T. famata, T. inconspicua, S. cerevisiae, S. rouxii, Cr. neoformans und Rh. mucilaginosa jeweils 1 Linie.

b) Serum gegen den Niederschlag nach 90%iger Ammonsulfatfällung: Die Homogenisate von C. brumptii, C. lipolytica, S. cerevisiae und Cr. neoformans präzipitierten auf der Anodenseite jeweils 1 Linie. Mit den übrigen Sproßpilz-Homogenisaten entstanden keine Präzipitationen.

c) Serum gegen den Überstand nach 90%iger Ammonsulfatfällung: Die Prüfung mit den Sproßpilz-Homogenisaten ergab nur je 1 Linie auf der Kathodenseite mit dem Rh.mucilaginosa- und dem S.cerevisiae-Homogenisat.

Tab. 5 Kreuzreaktionen der Antiseren der Ammonsulfat-Fractionen
von *C. utilis* mit heterologen Sproßpilz-Homogenisaten

Antiserum →	Niederschlag nach 50%iger			Niederschlag nach 90%iger			Überstand nach 90%iger		
Antigen →	Ammonsulfatfällung								
	An	A	K	An	A	K	An	A	K
C. albicans	++	-	-	-	-	-	-	-	-
C. tropicalis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. stellatoidea	-	+	+	-	-	-	-	-	-
C. krusei	-	+	-	-	-	-	-	-	-
C. pseudotrop.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. curvata	++	-	-	-	-	-	-	-	-
C. robusta	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C. guilliermondii	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. reukauffii	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. parapsilosis	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C. brumptii	-	-	-	+	-	-	-	-	-
C. lipolytica	+	-	-	+	-	-	-	-	-
C. macedoniensis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. scottii	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T. glabrata	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T. famata	+	-	+	-	-	-	-	-	-
T. dattila	+	-	-	-	-	-	-	-	-
T. inconspicua	-	-	+	-	-	-	-	-	-
S. cerevisiae	-	-	+	+	-	-	-	-	+
S. rouxii	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Cr. neoformans	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Rh. mucilaginosa	+	-	+	-	-	-	-	-	+
Sch. octosporus	-	-	-	-	-	-	-	-	-

An = Anode

A = Auftragspunkt

K = Kathode

+ = 1 Präzipitationslinie

- = negative Reaktion

D. Besprechung

=====

Ebenso wie bei den bisher untersuchten Sproßpilzen (*C. albicans* und *C. tropicalis*, MÜLLER und HIRSCH 1967; *C. krusei*, MÜLLER und DUPONT im Druck; *T. glabrata*, *T. famata*, *S. rouxii*, *S. cerevisiae*, *Sch. octosporus* und *Cr. neoformans*, KRANENBERG 1967) trennte sich auch das Homogenisat von *C. utilis* in der Agarelektrophorese in zwei Substanzgruppen auf. Die eine Gruppe, die zur Anode wanderte und sich mit Amidoschwarz anfärben ließ, besteht aus eiweißartigen Substanzen. Bei der anderen Gruppe, die zur Kathode wanderte und sich intensiv durch PAS-, dagegen nur schwach durch Amidoschwarzfärbung darstellen ließ, handelt es sich vermutlich um Glykoproteine.

Beide Substanzgruppen besitzen, wie die Immunelektrophorese mit dem homologen Antiserum gegen *C. utilis* zeigte, Antigencharakter. Soweit die mäßige elektrophoretische Wanderung der Glykoproteine eine Aussage erlaubt, konnten insgesamt 8 Antigene nachgewiesen werden.

Während die Glykoproteinantigene nach Erhitzen auf 60°C keine Veränderungen zeigten, erwies sich ein Teil der Eiweißantigene als thermolabil. Nach Erhitzen auf 100°C waren keine Eiweißantigene - vermutlich infolge Denaturierung - mehr nachweisbar. Unter den Glykoproteinantigenen konnte durch Kombination von Absorption und Immunelektrophorese ein bei 100°C thermolabiles Antigen nachgewiesen werden.

Die Absorptionsversuche mit intakten Zellen zeigten, daß nur Antikörper gegen die zur Kathode wandernden Antigene absorbiert werden. Daraus geht hervor, daß auch bei *C. utilis* die Eiweißantigene nur im Zellinhalt vorkommen, während die Glykoproteinantigene sowohl in den Zellwänden (Absorptionsvermögen) als auch im Zellinhalt (Wanderung in der Immunelektrophorese) lokalisiert sind.

Im Zellinhalt konnten wir das thermolabile Glykoproteinantigen direkt durch Reaktion der aus dem Zellinhalt extrahierten Antigene (Phenol/Wasser-Extraktion) mit dem Restantikörper, der durch Absorption des Anti-*C. utilis*-Serums mit erhitzten *C. utilis*-Zellen gewonnen worden war, nachweisen. In den Zellwänden muß das thermolabile Glykoprotein ebenfalls vorhanden sein, da wir bei Absorption mit nicht erhitzten *C. utilis*-Zellen keinen Restantikörper gegen zur Kathode wandernde Antigene nachweisen konnten. Der direkte Nachweis durch Extraktion aus den Zellwänden gelang nicht, da die durchgeführte Kalilaugenextraktion vermutlich das thermolabile Antigen inaktiviert hatte. Das erklärt die Fehldeutungen von KEMP und SOLOTOROWSKY (1964), die thermolabile Antigene bei *C. krusei*, *C. pseudotropicalis* und *C. parakrusei* nur im Zellinhalt postulierten. Sie verwendeten den Zellinhalt unbehandelt, während sie die Zellwände ebenfalls einer Alkaliextraktion unterwarfen. TSUCHIYA (1955), der wie andere Autoren - POSPISIL (1959), KEMP und SOLOTOROWSKY (1964) - bei den letztgenannten Sproßpilzen und als einziger auch bei *C. utilis* (1959) je ein thermolabiles Antigen nachwies, hätte aber mit seiner Methode, die nur die Zellwandantigene erfaßt, die thermolabilen Antigene nicht nachweisen können, wenn sie nicht auch in den Zellwänden vorkämen.

Im Hinblick auf eine spätere serologische Differenzierung von *C. utilis* erschienen uns die Kreuzreaktionen mit anderen Sproßpilzen interessant. Keine antigene Verwandtschaft konnten die immunoelektrophoretischen Untersuchungen zwischen *C. utilis* einerseits sowie *T. inconspicua*, *Cr. neoformans* und *Sch. octosporus* andererseits aufdecken. Gemeinsame Eiweißantigene mit *C. utilis* zeigten die Hefen *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. reukauffii*, *C. brumptii*, *C. lipolytica*, *C. scottii*, *T. glabrata*, *T. famata* und *S. rouxii*.

Außer *T. famata*, *C. brumptii* und den oben erwähnten, nicht mit *C. utilis* reagierenden Hefen zeigten die untersuchten Sproßpilze mindestens ein, einige auch mehrere gemeinsame Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigene mit *C. utilis*. Von den

Sproßpilzen, bei denen ein thermolabiles Antigen bekannt ist, reagierten mit absorbierten Anti-*C. utilis*-Serum (absorbiert mit auf 100°C erhitzten *C. utilis*-Zellen) *C. parapsilosis* und *C. stellatoidea*. Die Präzipitationen lagen aber so nahe am Auftragspunkt, daß sich nicht mit Sicherheit aussagen läßt, ob diese Reaktion mit dem Restantikörper gegen das thermolabile Glykoproteinantigen oder mit einem der gegen Eiweißantigene gerichteten Antikörper, die nicht absorbiert werden konnten, erfolgte.

Unsere Befunde stimmen weitgehend mit denen von TSUCHIYA (1965) überein. Abweichend sind die Ergebnisse bei *T. inconspicua*, *Cr. neoformans* und *T. famata*, bei denen TSUCHIYA jeweils 2 gemeinsame Antigene mit *C. utilis* fand, - *Sch. octosporus* wurde von ihm nicht untersucht. SEELIGER (1958) fand dagegen bei Verwendung von Fuller-Extrakten keine Antigengemeinschaft von *C. utilis* mit *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. macedoniensis* und *C. lipolytica*, sondern nur mit *C. albicans*, *S. cerevisiae* und *S. rouxii*. JONSEN (1955) prüfte ein Anti-*C. utilis*-Serum mit Alkaliextrakten aus verschiedenen *Candida*-Arten, unter denen mit Ausnahme von *C. brumptii*, *C. reukauffii* und *C. scottii* alle *Candida*-Arten vertreten waren, die von uns untersucht wurden. Er fand keine Reaktion dieser *Candida*-Arten mit dem Anti-*C. utilis*-Serum. Hier muß es sich entweder um ein sehr minderwertiges Serum gehandelt haben, oder die Antigene wurden bei der Alkaliextraktion, die in der Hitze durchgeführt wurde, weitgehend zerstört.

Nach MÜLLER (1967) können die geringen Diskrepanzen verschiedener Autoren bei der Feststellung von Antigengemeinschaften durch die angewendeten Methoden, durch Verwendung von Stämmen unterschiedlicher Serotypen und durch die unterschiedliche Qualität der Antiseren bedingt sein. Vor allem bei Immunisierungen mit einer Vielzahl von Antigenen, wie sie im Hefehomogenisat vorkommen, kommt es nach MÜLLER zu unterschiedlichen Antikörpertitern gegen die einzelnen Antigene, von denen einige unerschwellig sein können. So wären auch die zum Teil unterschiedlichen Befunde zwischen dem Homogenisat einiger Hefen

mit dem Anti-C.utilis-Serum und den Seren gegen diese Hefen mit dem C.utilis-Homogenisat zu erklären. Zum Beispiel zeigte das C.krusei-Homogenisat mit dem Anti-C.utilis-Serum keine Reaktion, dagegen präzipitierte das C.utilis-Homogenisat das Anti-C.krusei-Serum mit 4 Linien.

Um die Fehlermöglichkeiten, die bei Immunisierung mit einer Mischung aus zahlreichen Antigenen, wie sie im Homogenisat vorliegt, bedingt sind, auszuschalten, wurde der Zellinhalt von C. utilis fraktioniert. Da die Polysaccharide von C. albicans und C. tropicalis nach Phenol/Wasser-Extraktion keine Antikörperbildung ergeben hatten (MÜLLER, SIEGERT und PACHALY, 1964), wurde der Zellinhalt der Ammonsulfatbehandlung unterzogen. Dabei entstanden drei Fraktionen: der Niederschlag nach 50%iger Ammonsulfatsättigung, der nur zum geringen Teil in Wasser oder physiologischer NaCl-Lösung löslich, dagegen gut löslich in Alkali war und vermutlich das von BRUNNER (1960) beschriebene Zymocasein enthielt; ferner der Niederschlag nach 90%iger Sättigung, der bis auf Spuren in Wasser und physiologischer NaCl-Lösung löslich war und vermutlich die Cerevisine beinhalten; und schließlich der Überstand nach 90%iger Sättigung, in dem nur noch Polysaccharide nachweisbar waren.

Diese Fraktionen wurden in der Immunelektrophorese geprüft und zum Immunisieren verwendet. Kreuzreaktionen zwischen den Fraktionen und den gegen sie gerichteten Seren wiesen darauf hin, daß im Niederschlag nach 50%iger Sättigung und in dem nach 90%iger Sättigung 2 Eiweißantigene von gleicher Spezifität enthalten waren und in allen drei Fraktionen 1 Polysaccharidantigen gleicher Spezifität vorkam.

Die Ergebnisse der immunelektrophoretischen Untersuchungen der Fraktionsseren mit den Homogenisaten der Sproßpilze bestätigen die Vermutung, daß bei Immunisierung mit einer kleineren Zahl von Antigenen die einzelnen Antikörper stärker ausgeprägt sind. So konnten durch das Serum gegen den Niederschlag nach 50%iger Sättigung, das 4 Antikörper gegen Eiweißantigene enthielt, zusätzliche Eiweißantigengemeinschaften mit C. curvata (2 gemeinsame Antigene), C. robusta, C. parapsilosis, T. dattila

und Rh. mucilaginosae (jeweils 1 gemeinsames Antigen) aufgedeckt werden.

Das Serum gegen den Niederschlag nach 90%iger Ammonsulfat-sättigung ließ jeweils 1 gemeinsames Eiweißantigen mit S. cerevisiae und Cr. neoformans erkennen, das durch das Serum gegen das C.utilis-Homogenisat nicht nachgewiesen worden war.

Nicht alle Antigene wurden durch diese Fraktionierung erfaßt. Vermutlich war ein Teil der empfindlichen Eiweiße denaturiert (unlösliche Rückstände) und ein Teil der Glykoproteinantigene so verändert, daß sie nur noch Haptencharakter besaßen. Es muß weiteren Isolierungsmethoden vorbehalten bleiben, auch die restlichen Antigene zu ermitteln.

Abweichend von allen bisherigen Ergebnissen an Sproßpilzen änderte sich die Wanderungsrichtung nach physikalischer oder chemischer Behandlung einiger Glykoproteine von C. utilis. So ließen sich im agarelektrophoretischen Präparat des erhitzten Homogenisats auf der Anodenseite intensiv mit PAS angefärbte Substanzen nachweisen, die sich mit dem nicht erhitzten Homogenisat nicht dargestellt hatten. Die gleichen Befunde traten auf nach Phenol-Kalt-Extraktion des Zellinhalts, nach Alkaliextraktion der Zellwände sowie im Überstand nach Ammonsulfatbehandlung. Bei allen diesen Fraktionen war die Bande auf der Anodenseite intensiv mit PAS, aber nur schwach mit Amidoschwarz angefärbt. Beim 90%igen Überstand, beim Alkaliextrakt und dem Phenol/Wasser-Extrakt stellten sich durch PAS-Färbung zusätzlich noch 2 scharfe Banden zur Kathode hin dar, die nur nach Fixierung in 90%igem Alkohol deutlich nachweisbar waren und sich nicht mit Amidoschwarz anfärben ließen.

Diese Befunde legen folgende Deutung nahe: Der Anteil der PAS-positiven Substanzen, der nach Erhitzen und Extraktionsverfahren zur Anode wandert, besteht vermutlich aus Glykoproteinen (schwache Amidoschwarzfärbung), deren Trägersubstanzen durch die Behandlung so verändert werden, daß sie ihre Wanderungsrichtung in der Elektrophorese ändern. Bei den auch nach der Behandlung auf der Kathodenseite befindlichen Substanzen handelt es sich vermutlich um reine Polysaccharide, da sie nur

nach Alkohol-, nicht aber nach Methyleisessig-Fixierung nachweisbar sind (WIEME, 1965). Diese in der Agarelektrophorese nachgewiesene Änderung der Wanderungsrichtung erklärt auch, warum der Überstand nach 90%iger Ammonsulfatfällung sowie die Extrakte nach Behandlung mit Phenol/Wasser oder KOH in der Immunelektrophorese Präzipitate auf der Anodenseite bilden, obgleich sie keine Eiweißantigene mehr enthalten.

E. Zusammenfassung

Da *C. utilis* durch ihre Verwendung in der Industrie sehr verbreitet ist, wäre ihre Abgrenzung im Untersuchungsmaterial gegen die fakultativ pathogenen Hefen wünschenswert. Zur Durchführung einer serologischen Differenzierung ist die Kenntnis der Antigenstruktur sowie der Antigenverwandtschaften zu anderen Sproßpilzen unerlässlich. Es wurden deshalb mit Hilfe der Agar- und Immunelektrophorese die Antigenstruktur von *C. utilis* untersucht und Kreuzreaktionen mit einer Auswahl von Sproßpilzen durchgeführt.

Mit Hilfe der Agarelektrophorese und Spezialfärbungen ließen sich zwei unterschiedliche Substanzgruppen nachweisen, nämlich Eiweiße und Glykoproteine. Beide Stoffgruppen erwiesen sich im Tierversuch als antigen. Die Glykoproteine sind sowohl im Zellinhalt als auch in den Zellwänden, die Eiweißantigene nur im Zellinhalt vorhanden. Während unter den Eiweißantigenen mehrere bei 60°C thermolabil waren, erwies sich nur ein Glykoprotein bei 100°C als thermolabil. Letzteres fand sich sowohl im Zellinhalt als auch in den Zellwänden.

Die zur Antigenisolierung angewendeten physikalischen oder chemischen Behandlungen veränderten die Struktur der Glykoproteine derart, daß sie in der Elektrophorese ihre Wanderungsrichtung änderten. Die serologische Spezifität der thermostabilen Glykoproteine wurde durch die Extraktionsmethoden nicht beeinflusst. Die Ergebnisse der Kreuzreaktionen mit anderen Hefen zeigten weitgehende Übereinstimmung mit den von anderen Autoren nachgewiesenen Antigengemeinschaften. Bisher waren die Eiweißantigene für die Bestimmung von Verwandtschaften zwischen *C. utilis* und anderen Hefen nicht berücksichtigt worden. Wir fanden gemeinsame Eiweißantigene mit *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. curvata*, *C. robusta*, *C. reukauffii*, *C. parapsilosis*, *C. brumptii*,

C. lipolytica, *C. scottii*, *T. glabrata*, *T. famata*, *T. dattila*,
S. cerevisiae, *S. rouxii*, *Cr. neoformans*, *Rh. mucilaginosa* und
C. utilis, die z.T. erst durch Verwendung von Antiseren gegen
Antigenfraktionen sichtbar wurden.

F. L i t e r a t u r

=====

- BRUNNER, R.: Eiweißstoffe. In: Die Hefen. Bd 1: Die Hefen in der Wissenschaft, T. B, 1., IV., 368-402. Verlag Hans Carl, Nürnberg, 1960.
- BUTSCHEK, G.: Nähr- und Futterhefen. In: Die Hefen. Bd 2: Technologie der Hefen, T. B, 5., 611-664. Verlag Hans Carl, Nürnberg, 1962.
- GRABAR, P.: Immunelektrophoretische Analyse. Behringwerk-Mitteilungen 30 (1955), 23-30.
- JONSEN, J.: Serological studies in genus Candida. Thesis Oslo 1955.
- KEMP, G., and M. SOLOTOROVSKY: Localization of antigens in mechanically disrupted cells of certain species of the genera Candida and Torulopsis. J. Immunol. 93 (1964), 305-314.
- KLEMM, R.: Gewinnung von Ribonucleinsäure und ihren Spalt- und Umwandlungsprodukten aus Hefe. In: Die Hefen. Bd 2: Technologie der Hefen, T. D, 2., 828-845. Verlag Hans Carl, Nürnberg, 1962.
- KRANENBERG, K.: Immunelektrophoretische Untersuchungen über Antigengemeinschaften zwischen Sproßpilzen verschiedener Species. Dissertation Marburg 1967.
- LODDER, J., and N.J.W. KREGER-VAN RIJ: The Yeasts. A taxonomic study. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1952.
- MÜLLER, H.-L., R. SIEGERT und D. PACHALY: Zur Antigenstruktur von Candida albicans und tropicalis. 2. Mitteilung: Serologisches Verhalten von Zellmembran und Zellinhalt nach Phenol/Wasser-Extraktion. Zbl. Bakt. I Orig. 193 (1964), 117-122.

- MÜLLER, H.-L. und M. HIRSCH: Zur Antigenstruktur von *Candida albicans* und *tropicalis*. 4. Mitteilung: Immunelektrophoretische Antigenstudien an Zellmembran und Zellinhalt.
Zbl. Bakt. I Orig. 202 (1967), 247-256.
- MÜLLER, H.-L. und H. DUPONT: Zellwand- und Zellinhaltantigene von *Candida krusei*.
Zbl. Bakt. I Orig. (im Druck).
- MÜLLER, H.-L.: Habilitationsschrift Marburg 1967.
- POSPISIL, L.: Agglutinations-, Komplementbindungs- und Hämagglutinationsreaktion bei der Bestimmung von *Candida*-Arten.
Dermatologia 118 (1959), 65-73.
- SEELIGER, H.P.R.: Mykologische Serodiagnostik.
Johann Ambrosius Barth Verlag, Leipzig, 1958.
- SEELIGER, H.P.R.: Serodiagnostik der Pilze und mykotischen Infektionen.
Zbl. Bakt. I Orig. 184 (1962), 203-226.
- STOLZENBACH, G.: Versuche zur Isolierung von Eiweißantigenen aus dem Zellinhalt von *Candida albicans*.
Dissertation Marburg 1967.
- TSUCHIYA, T., Y. FUKAZAWA, F. MIYASAKI und S. KAWAKITA: Studies on the classification of the genus *Candida*. 3: Thermostable and thermolabile antigens of the seven species of the genus *Candida*.
Jap. J. Exp. Med. 25 (1955), 75-83.
- TSUCHIYA, T., Y. FUKAZAWA und S. KAWAKITA: A method for the rapid identification of the genus *Candida*.
Mycopathol. et Mycol. appl. 10 (1959), 191-206.
- TSUCHIYA, T., Y. FUKAZAWA und S. KAWAKITA: Significance of serological studies on yeasts.
Mycopathol. et Mycol. appl. 26 (1965), 1-15.

- WESTPHAL, O., O. LÜDERITZ und F. BISTER: Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser.
Zschr. Naturforsch. 76 (1952), 148-155.
- WIEME, R.J.: Agar Gel Electrophoresis.
Elsevier Publishing Company,
Amsterdam, London, New York, 1965.
- WINDISCH, S.: Das System der hefeartigen Pilze. In: Die Hefen.
Bd 1: Die Hefen in der Wissenschaft, T. A, 1.,
IV., 138-178.
Verlag Hans Carl, Nürnberg, 1960.

Herrn Professor Dr. med. R. Siegert danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und die freundliche Unterstützung meiner Arbeit.

Frau Dozentin Dr. med. H.-L. Müller danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die mir jederzeit gewährte Hilfe und Beratung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 1. April 1938 wurde ich als Tochter des kaufm. Angestellten Willi Griebel und seiner Ehefrau Erna, geb. Stössel, in Sondershausen/Thüringen geboren. Ich besuchte dort von 1944 bis 1952 die Grundschule und anschließend die Geschwister-Scholl-Oberschule, an der ich im Mai 1956 mein Abitur bestand. Im gleichen Jahr nahm ich eine Praktikantenstelle im Labor für Hormonforschung des VEB Jenapharm, Jena, an.

1957 flüchtete ich in die Bundesrepublik. In Darmstadt absolvierte ich im März 1958 den Abiturergänzungskurs. Im Wintersemester 1958/59 ließ ich mich an der Philosophischen Fakultät der Universität Marburg einschreiben, im Sommersemester 1959 wechselte ich zur Medizinischen Fakultät über. Ich studierte die vorklinischen und klinischen Semester an der Universität Marburg. Nach einjähriger, durch Krankheit bedingter Pause bestand ich im März 1966 das medizinische Staatsexamen. Danach begann ich meine Doktorarbeit am Hygiene-Institut der Universität Marburg.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten in Marburg:

Beckmann, Berendes, Bickel, Bock, Braun-Falco, Bücher,
Dimroth, Dölle, du Mesnil de Rochemont, Eggstein, Exner,
Gedigk, Golenhofen, Gross, Grüter, Hamm, Hartmann, Hensel,
Heuser, Hildebrandt, Hornung, Huber, Jacob, Kessler, Knauff,
Kottmeyer, Lang, Linneweh, Löhr, Lübbers, Mahr, Mann, Mar-
tini, Marx, Mattes, Maurath, Müller, Neubauer, Niessing,
Nieth, Oksche, Oehme, Petry, Rodenhäuser, Salfeld, Sauer,
Schlegel, Schleyer, Schmid, Schmitz, Schölmerich, Schrappe,
Schultze, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Stein, Stender,
Straub, Streicher, Vogell, Vogt, Walcher, Waller, Wendt,
Würterle.

